Aus dem Bundesgesundheitsamt Berlin
Robert - Koch - Institut
Abteilung für Virusforschung
Direktor: Professor Dr. med. Georg Henneberg

Die Änderung der Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen Virus und Immunserum nach einer Reihe von Ei- und Mauspassagen von Influenzavirusstamm A/1/England/19/55.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Hintz
aus Stettin/Oder

1968

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Bundesgesundheitsamt Berlin
Robert - Koch - Institut
Abteilung für Virusforschung
Direktor: Professor Dr. med. Georg Henneberg

Die Änderung der Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen Virus und Immunserum nach einer Reihe von Ei- und Mauspassagen von Influenzavirusstamm A/1/England/19/55.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Hintz
aus Stettin/Oder

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Professor Dr. med. Georg H e n n e b e r g

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 13. März 1968

Übersicht

	Seite
Darlegung der Aufgabenstellung	1
Methoden und Material	3
Experimentelle Ergebnisse	7
Zusammenfassende Betrachtung	28
Schrifttum	30

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0047

A) DARLEGUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Der Hämagglutinationshemmtest (13) hat bei Influenzaviren zur Diagnostik der durch sie verursachten Erkrankungen sowie zur Typisierung und Charakterisierung der Virusstämme weitgehende Anwendung gefunden. Die Aussagefähigkeit dieser Methodik hängt jedoch entscheidend davon ab, bis zu welchem Grade eine sichere Spezifitätsbeurteilung der registrierten Antigen-Antikörper-Reaktionen gegeben ist. Nur wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, wird man unter Verwendung von bekanntem Virus eine sichere Diagnostik von Antikörpern vornehmen und umgekehrt unbekannte Virusstämme unter Verwendung bekannter Immunseren identifizieren können.

Einen entscheidenden Fortschritt hinsichtlich der Spezifitätsbeurteilung des Hämagglutinationshemmtestes stellt die Einführung der sogenannten photometrischen ACU-Methode (7) dar. Die Spezifitätsbeurteilung erfolgt hierbei auf der Grundlage der Beobachtung, daß nur für die Reaktion von Virus mit homologen Antikörpern die Freundlichsche Adsorptionsisotherme gültig ist, während für die Reaktion von Virus mit heterologen Antikörpern eine grundsätzlich andere Proportionalität vorherrscht (5). Registriert man daher die Kinetik der Reaktion zwischen Virus und Antikörpern, so kann man prüfen, inwieweit diese die für homologe Reaktionspartner charakteristischen Merkmale aufweist, und kann auf diesem Wege eine sichere Unterscheidung zwischen homologen und heterologen Antigen-Antikörper-Reaktionen vornehmen.

Es ist ein Charakteristikum von Influenzaviren des Types A, daß ihre Reaktionsfähigkeit im Hämagglutinationstest in Abhängigkeit von dem Wirt, in dem das Virus synthetisiert wurde, variiert. Für dieses Phänomen hat man die Bezeichnung "Phasenwechsel" (1) eingeführt. Frisch vom Menschen isoliertes Virus, also Virus der sogenannten O-Phase (ori-

ginal phase) weist ein wesentlich größeres Reaktionsvermögen gegenüber Menschen- oder Meerschweinchenerythrocyten als gegenüber Hühnererythrocyten auf, während nach Durchlaufen einiger Eipassagen, also nach dem Übergang in die sogenannte D-Phase (derivative phase), das umgekehrte Verhalten (höhere Reaktionsfähigkeit gegenüber Hühnererythrocyten als gegenüber Menschen- oder Meerschweinchenerythrocyten) beobachtet wird (1). Die Ursache dieses Phasenwechsels ist darin zu sehen, daß das Virus in Abhängigkeit von dem Wirt, in dem es synthetisiert wurde, normale Bestandteile der Wirtszelle, sogenannte Normalkomponenten (3), in sich trägt und daß diese die Reaktionsfähigkeit des Virus gegenüber speciesgleichen oder speciesungleichen Erythrocyten beeinflussen.

Für die Diagnostik von Virus oder Antikörpern mittels des Hämagglutinationshemmtestes bringt der Phasenwechsel der Influenzaviren folgende Problematik mit sich: Der Antikörpertiter eines Serums wird im Hämagglutinationshemmtest als diejenige höchste Serumverdünnung bestimmt, die gerade noch in der Lage ist, die hämagglutinierende Aktivität einer gegebenen Virusdosis zu hemmen. Die Anzahl an Virusteilchen, die dieser hämagglutinierenden Dosis entsprechen, wird jedoch je nach der Art der vorliegenden Virusphase und der dann zu verwendenden Erythrocytenart variieren, so daß in Abhängigkeit von der Phase des verwendeten Virus der Antikörper eines gegebenen Serums erhebliche Schwankungen aufweisen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit der Zielsetzung durchgeführt zu prüfen, inwieweit die Verwendung von unterschiedlichen Phasen eines Virusstammes zur Antikörpertitration mittels der photometrischen ACU-Methode den Nachweis des Vorliegens einer homologen Antigen-Antikörper-Reaktion stört.

Hierfür wurde der Influenzavirusstamm A/1/England/19/55

zusätzlich einer Reihe von Ei- und Mäusepassagen unterworfen und die Reaktionsfähigkeit der erhaltenen Viruspräparationen gegenüber homologen Antikörpern getestet.

Weiterhin wurden Antiseren gegen jede dieser Viruspräparationen hergestellt und geprüft, ob Impfung mit Virus unterschiedlichen Adaptationsgrades die Bildung von Antikörpern auslöst, deren Reaktionsfähigkeit gegenüber unterschiedlichen Virusphasen des homologen Stammes variiert und inwieweit hierdurch die Spezifitätsbeurteilung der Antigen-Antikörper-Reaktion beeinträchtigt wird.

B. METHODEN UND MATERIAL

1.) Virus:

Es wurde der eiadaptierte Influenzavirusstamm A/1/England/19/55 verwendet. Mit dem Ausgangsvirus wurden 10 Hühnerei- und 10 Mäuselungenpassagen durchgeführt. Die Infektion der 10tägig bebrüteten Hühnereier erfolgte durch Injektion von je 0,2 ml der 1 : 1000 verdünnten Virussuspension in die Allantoishöhle. Die narkotisierten Mäuse wurden durch Aspiration von je 0,1 ml unverdünnter Virussuspension in die tiefen Atemwege infiziert. Die Übertragung des Virus von Maus zu Maus gelang bei den ersten Passagen nicht in jedem Fall, da viele Tiere nicht erkrankten. Von der fünften Passage an bereitete die Übertragung jedoch keine Schwierigkeiten mehr, da sich das Virus inzwischen mausadaptiert hatte und bei den Mäusen schwere Pneumonien erzeugte. Die Mäuselungenextrakte waren jedoch trotzdem so niedrigtitrig, daß sie für die Testung der Reaktion zwischen Virus und Immunserum keine Verwendung finden konnten. Um genügend hochtitriges Virusmaterial zu gewinnen, wurden bis zu 8 Eipassagen angeschlossen.

2.) Antiseren:

Seren gegen die verschiedenen Viruspräparationen wurden in Meerschweinchen nach der Technik des sogenannten Antigendauerreizes (9) hergestellt. Die Seren wurden vor ihrer Testung mit m/90 KJO_4 vorbehandelt (8).

3.) Kennzeichnung der Viruspräparate und Antiseren:

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:
A-Virus = eiadaptiertes Ausgangsvirus
E-Virus = eipassagiertes Virus
M-Virus = mauspassagiertes Virus
A-Serum = zum Ausgangsvirus dazugehöriges Immunserum
E-Serum = zum eipassagierten Virus dazugehöriges Serum
M-Serum = zum mauspassagierten Virus dazugehöriges Serum

Zwischen 3 verschiedenen Viren und 3 verschiedenen Immunseren sind 9 verschiedene Antigen-Antikörper-Reaktionen möglich. Von den möglichen Reaktionen finden 3 zwischen passagegleichen und 6 zwischen passageungleichen Reaktionspartnern statt.

	A-Serum	E-Serum	M-Serum
A-Virus	passagegleich	passageungleich	passageungleich
E-Virus	passageungleich	passagegleich	passageungleich
M-Virus	passageungleich	passageungleich	passagegleich

Tab. 1 Die 9 möglichen Antigen-Antikörper-Reaktionen zwischen Viren und Immunseren

4.) Testung im Hämagglutinationshemmtest mit visueller Ablesung:

Die Testdurchführung erfolgte nach der von G. Henneberg und H. Köhler (13) beschriebenen Technik. Die Titerwerte wurden als reziproke Serumverdünnung, die gerade ausreich-

te, um komplette Hämagglutinationshemmung von 2 agglutinierenden Virusdosen zu ergeben, angegeben.

Zur Kennzeichnung der Reaktionsfähigkeit von Virus mit passagegleichem und passageungleichem Antiserum im Test mit visueller Ablesung wurde ein Reaktionsfähigkeitsquotient c' wie folgt definiert:

$$c' = \frac{HI_{ungleich}}{HI_{gleich}} \qquad (1)$$

$HI_{ungleich}$ = Hämagglutinationshemmtiter gegen passageungleiches Antiserum

HI_{gleich} = Hämagglutinationshemmtiter gegen passagegleiches Antiserum

5.) Aufnahme der Adsorptionsisotherme:

Die Technik entsprach den von Drescher, Davenport und Hennessy (6) gemachten Angaben.

Auf die Reaktion zwischen Virus und passagegleichem Antiserum kann die Freundlichsche Adsorptionsisotherme (12) in folgender Form angewendet werden:

$$\lg(Cbv \cdot dab) = \frac{1}{N} \lg Cfv + \lg a + \lg Tab \qquad (2)$$

Cbv = Konzentration an gebundenem Virus (HCU)
Cfv = Konzentration an freiem Virus (HCU)
dab = reziproke Serumverdünnung im Versuchsansatz
a, 1/N = Konstante der Adsorptionsisotherme
Tab = Antikörpertiter (ACU)

Bei Vergleichsuntersuchungen von Seren mittels der photometrischen ACU-Methode (6) und mittels des Testes mit visueller Ablesung (13) wurde gefunden, daß die ACU-Titerwerte dann in die Größenordnung der im Test mit visueller Ablesung erhaltenen Titerwerte fielen, wenn für a der Wert 20 eingesetzt wurde. Somit folgt:

$$\lg(Cbv \cdot dab) = \frac{1}{N} \lg Cfv + \lg 20 + \lg Tab \qquad (3)$$

Um Unterschiede der Reaktionsfähigkeit von Virus mit passageungleichen Antiseren zu berücksichtigen, wurde für diese Reaktionen Gleichung (3) in folgender durch Einführung des entsprechenden Reaktionsfähigkeitsquotienten c modifizierter Form angewendet:

$$\lg(Cbv \cdot dab) = \frac{1}{N} \lg Cfv + \lg 20 + \lg(c \cdot Tab) \quad (4)$$

Die für die Reaktion eines Serums mit passageungleichem Virus erhaltenen Antikörpertiterwerte wurden mit Tab_{eff} bezeichnet, wobei folgende Festsetzung gilt:

$$c = \frac{Tab_{eff}}{Tab} \quad (5)$$

Somit besteht für die Reaktion von Seren mit passageungleichem Virus die Gleichung

$$\lg(Cbv \cdot dab) = \frac{1}{N} \lg Cfv + \lg 20 + \lg Tab_{eff}. \quad (6)$$

Zur Bestimmung der Werte für den Reaktionsfähigkeitsquotienten c wurde wie folgt verfahren:
Die arithmetischen Mittel der Werte für lg(Cbv . dab) und für lg Cfv, die für die Reaktion eines Serums mit passagegleichem Virus erhalten wurden, wurden in die Gleichung (3) eingesetzt und durch Auflösen nach Tab der Antikörpertiter ermittelt. In analoger Weise wurde der Wert für Tab_{eff} für die Reaktion eines Serums mit passageungleichem Virus ermittelt und der Wert für c nach Gleichung (5) berechnet.

Für die Reaktion der Seren mit Virus wurden die Regression und Korrelation zwischen den Logarithmen der Werte für (Cbv . dab) und den Logarithmen der Werte für Cfv berechnet und daraus die Werte der Konstanten 1/N errechnet. Ferner wurde geprüft, ob eine lineare Beziehung zwischen den Logarithmen von (Cbv . dab) und den Logarithmen von Cfv (10, 11) nachweisbar war.

C) EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

I) Bestimmung der F/G-Indices

Im visuellen Hämagglutinationstest wurden die Hämagglutinationstiter der 3 Viruspräparate gegenüber Hühner- und Meerschweinchenerythrocyten bestimmt. Aus den Hämagglutinationstiterwerten wurden die F/G-Indices (1) berechnet. Unter F/G-Index versteht man das Verhältnis des Hämagglutinationstiters eines Viruspräparates gegenüber Hühner (fowl)-Erythrocyten zum Hämagglutinationstiter desselben Viruspräparates gegenüber Meerschweinchen(guinea-pig)-Erythrocyten. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Virus	F/G-Index
A-Virus	1,4
E-Virus	1,1
M-Virus	2,5

Tab. 2

Bei allen 3 vorliegenden Viruspräparaten handelte es sich um D-Phasen-Virus. Das M-Virus besaß dabei den höchsten F/G-Index. Wegen der geringen Anzahl der durchgeführten Versuche ließen sich die Unterschiede der F/G-Indices statistisch nicht sichern.

II) Bestimmung der Hämagglutinationshemmtiter und Reaktionsfähigkeitsquotienten der Immunseren im visuellen Hämagglutinationshemmtest

In einer Reihe von Versuchen wurden im visuellen Hämagglutinationshemmtest die Hämagglutinationshemmtiter und daraus die Reaktionsfähigkeitsquotienten bestimmt. In Tabelle 3 sind die Versuchsergebnisse dargestellt.

In den folgenden Ausführungen bedeuten:

HI = Hämagglutinationshemmtiter
c' = Reaktionsfähigkeitsquotient
AV = eiadaptiertes Ausgangsvirus

MV = mauspassagiertes Virus
AS = zum Ausgangsvirus dazugehöriges Immunserum
ES = zum eipassagierten Virus dazugehöriges Serum
MS = zum mauspassagierten Virus dazugehöriges Serum

Reaktion	HI	c'
A-Serum mit A-Virus	900	1,00
A-Serum mit E-Virus		
A-Serum mit M-Virus	600	0,64
E-Serum mit A-Virus		
E-Serum mit E-Virus	6100	1,00
E-Serum mit M-Virus		
M-Serum mit A-Virus	2100	0,23
M-Serum mit E-Virus		
M-Serum mit M-Virus	9500	1,00

Tab. 3 Hämagglutinationshemmtiter und Reaktionsfähigkeitsquotienten für die Reaktionen zwischen Immunseren und Viren im visuellen Hämagglutinationshemmtest von Influenzavirusstamm A/1/England/19/55

1.) Die Hämagglutinationshemmtiter der Immunseren gegenüber den passagegleichen Viren verhalten sich ungefähr

$$HI_{AS} : HI_{ES} : HI_{MS} = 1 : 7 : 10.$$

2.) Die Reaktionsfähigkeitsquotienten der Immunseren gegenüber den passagegleichen Viren verhalten sich definitionsgemäß

$$c'_{AS} : c'_{ES} : c'_{MS} = 1 : 1 : 1.$$

3.) Die Reaktionsfähigkeitsquotienten der Immunseren gegenüber den passageungleichen Viren verhalten sich im

Vergleich dazu

$$c'_{AS} : c'_{ES} : c'_{MS} = 1{,}00;\ 0{,}64 : 1{,}00 : 0{,}23.$$

Hämagglutinationshemmtiter und Reaktionsfähigkeitsquotienten weisen deutliche Unterschiede auf. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der HI und c' der Immunseren wurde untersucht. Für den Unterschied zweier Durchschnitte gilt die t-Verteilung von Student (14). Es wurden folgende statistisch signifikante Ergebnisse erhalten:

4.) Unterschiede der Hämagglutinationshemmtiter der Immunseren mit passagegleichen Viren:

a) Der HI des AS unterscheidet sich statistisch gesichert ($P < 0{,}001$) von den HI des ES und MS.

b) Der Unterschied des HI des ES von dem HI des MS ist statistisch höchst wahrscheinlich ($P < 0{,}01$).

5.) Unterschiede der Reaktionsfähigkeitsquotienten:

a) Der Unterschied des c' des MS mit dem MV gegenüber den c' des MS mit dem AV und EV ist statistisch gesichert ($P < 0{,}001$).

b) Der Unterschied des c' des AS mit dem AV gegenüber dem c' des AS mit dem MV ist statistisch höchst wahrscheinlich ($P < 0{,}01$).

III) Beispiel für die Aufnahme der Freundlichschen Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen Virus und Immunserum mit der photometrischen ACU-Methode

Es wird die Freundlichsche Adsorptionsisotherme

$$\lg(Cbc \cdot dab) = 1/N \lg Cfv + \lg(a \cdot c \cdot Tab)$$

aus einem Protokoll für die Reaktion zwischen M-Serum und A-Virus berechnet. Aus den vorgewählten Immunserumverdünnungen und den gemessenen Extinktionswerten wurde eine Anzahl von Wertepaaren (x_i; y_i) berechnet (4, 6),

welche in der Größenordnung des Meßfehlers der photometrischen ACU-Methode von der Adsorptionsisotherme abwich. Damit aus diesen Wertepaaren die Konstanten der Freundlichschen Adsorptionsisotherme bestimmt werden konnten, mußten durch Anwendung statistischer Formeln (14) die Meßfehler berücksichtigt werden.

1.) Berechnung des Regressionskoeffizienten 1/N

Für die Berechnung des Anstieges gilt die Formel der Fehlerausgleichsrechnung

$$m = \frac{Sx_i y_i - Sx_i \bar{y}}{Sx_i^2 - N\bar{x}^2} \quad . \qquad (7)$$

Hierin sind:

m = 1/N
x_i = lg Cfv
y_i = lg(Cbv . dab)
S = Summe der Quadrate oder Produkte
N = Anzahl der Meßwerte
$\bar{x}$ = Sx_i/N
$\bar{y}$ = Sy_i/N

Es errechnet sich

$$m = \frac{148{,}3338 - 148{,}0870}{35{,}7141 - 35{,}3962},$$

$$\underline{m = 0{,}7763}.$$

2.) Berechnung des effektiven Antikörpertiters Tab_{eff}

Das Wertepaar $(\bar{x}; \bar{y})$ befriedigt die Adsorptionsisotherme. Eingesetzt ist

$$\bar{y} = m\,\bar{x} + \lg a + \lg(c \cdot Tab),$$
$$\lg(c \cdot Tab) = \bar{y} - m\,\bar{x} - \lg a,$$
$$\lg Tab_{eff} = 3.35106,$$
$$\underline{Tab_{eff} = 2244.}$$

3.) Berechnung des Antikörpertiters Tab

Der Antikörpertiter wurde aus den passagegleichen Reaktionen zwischen M-Serum und M-Virus erhalten. Es ergab sich

$$\underline{\text{Tab} = 10740 \text{ ACU}}.$$

4.) Berechnung des Reaktionsfähigkeitsquotienten c

Aus effektivem Antikörpertiter und Antikörpertiter errechnet sich der Reaktionsfähigkeitsquotient für die Reaktion zwischen M-Serum und A-Virus. Es ist

$$c = \frac{\text{Tab}_{\text{eff}}}{\text{Tab}},$$

$$c = \frac{2244}{10740},$$

$$\underline{c = 0{,}209}.$$

5.) Graphische Darstellung der Freundlichschen Adsorptionsisotherme

Die $(x_i; y_i)$-Wertepaare können graphisch dargestellt werden. Als Meßpunkte der Adsorptionsisotherme sind sie mit einem Meßfehler behaftet. Mit Hilfe der Fehlerausgleichsrechnung lassen sich aus den $(x_i; y_i)$-Wertepaaren die Konstanten der Adsorptionsisotherme bestimmen, womit dann die Isotherme erhalten wird. In Abbildung 1 werden die Schar der Meßpunkte des Versuches mit 2 Serumverdünnungsreihen und die dazugehörige Freundlichsche Adsorptionsisotherme graphisch dargestellt.

6.) Nachweis der Korrelation

Durch die im Experiment gefundene Schar der Meßpunkte wurde mit Hilfe statistischer Methoden die Adsorptionsisotherme gelegt. Dies ist aber nur möglich, wenn zwischen den einzelnen Meßpunkten eine funktionelle Beziehung besteht, die als Korrelation bezeichnet wird. Die Korrelation wird durch den Korrelationskoeffizienten r festgelegt. Seine Formel lautet

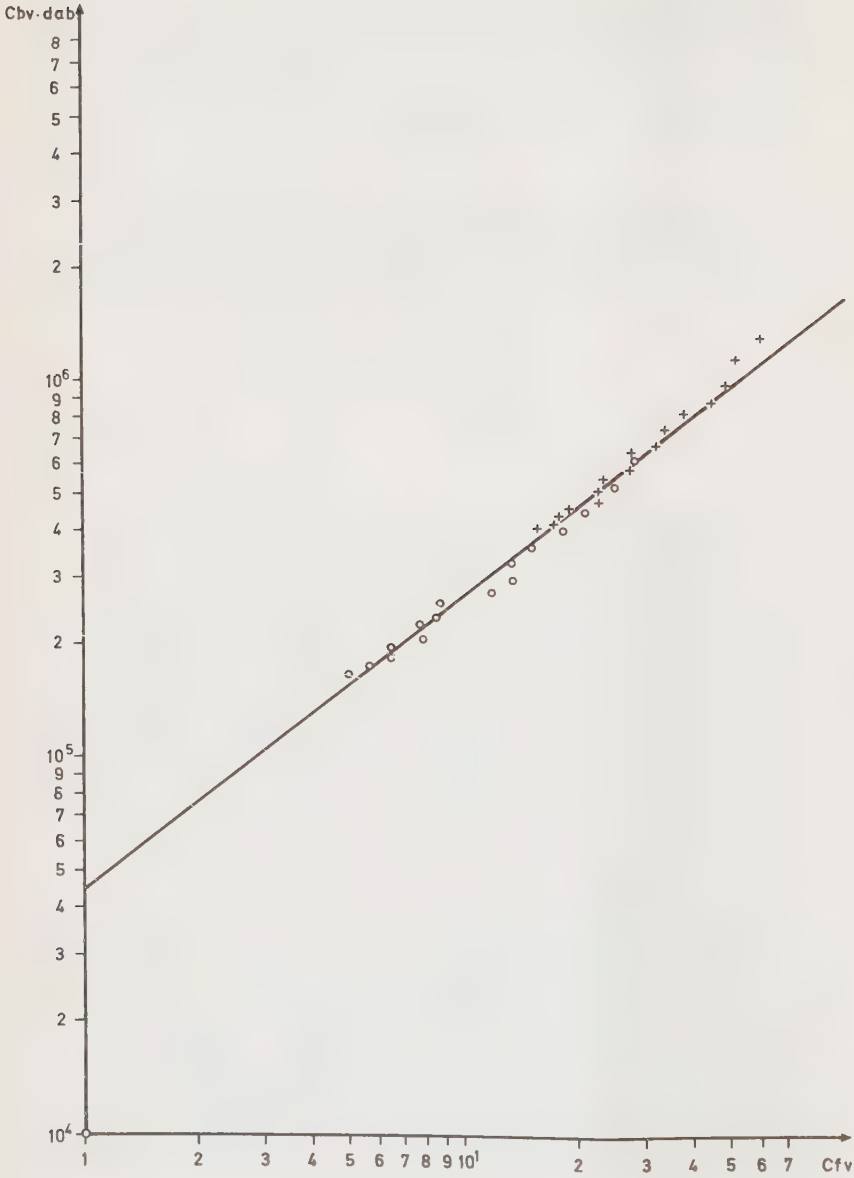


Abb. 1. Adsorptionsisotherme aus einem Versuchsprotokoll für die Reaktion zwischen M-Serum und A-Virus

$$r = \frac{Sx_i y_i - Sx_i \bar{y}}{\sqrt{(Sx_i^2 - N\bar{x}^2)(Sy_i^2 - N\bar{y}^2)}}. \qquad (8)$$

In unserem Beispiel ist

$$r = \frac{156{,}0952 - 155{,}7272}{\sqrt{(44{,}2285 - 43{,}7190)(554{,}9737 - 554{,}7024)}},$$

$\underline{r = 0{,}9903.}$

Freiheitsgrade $n = N - 2 = 14$
Sicherheitsschwelle $P = 0{,}001$
Sicherheitspunkt $r_p = 0{,}7420$

Der Korrelationskoeffizient ist wesentlich größer als der Sicherheitspunkt. Seine Abweichung von Null ist statistisch gesichert. Es besteht eine funktionelle Beziehung zwischen den einzelnen Meßpunkten.

7.) Nachweis der Linearität

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen den einzelnen Meßpunkten gestattet noch keine Aussage über einen linearen Zusammenhang. Die lineare Beziehung ist aber unbedingte Voraussetzung für die Gültigkeit der Freundlichschen Adsorptionsisotherme in ihrer logarithmierten Form. Zum Nachweis der Linearität (10, 11) werden die Meßpunkte eines Versuches nach steigenden x_i-Werten in zwei gleichgroße Gruppen A und B geteilt. In der Gruppe A sind die Meßpunkte mit den niedrigen x_i-Werten, in der Gruppe B diejenigen mit den hohen x_i-Werten zusammengefaßt. In jeder Gruppe werden der Anstieg 1/N und die Verschiebung lg(a . c . Tab) berechnet. Nur wenn die beiden Anstiege untereinander und die beiden Verschiebungen untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen, darf die Funktion als linear angesehen werden.

Die Werte für die Anstiege und Verschiebungen beider Gruppen wurden auf signifikante Unterschiede geprüft. Es gilt die t-Verteilung von Student. Folgende Abkürzungen werden verwendet:

A = Gruppe der niedrigen x_i-Werte
B = Gruppe der hohen x_i-Werte
m = 1/N
b = lg(a . c . Tab)
|s.e.m| = Absolutwert des "standard error" des Anstiegs
|s.e.b| = Absolutwert des "standard error" der Verschiebung

a) $$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{|s.e.m_A| + |s.e.m_B|}} \qquad (9)$$

$$t = \frac{0,8013 - 0,6710}{\sqrt{0,1141 + 0,05964}}$$

$$\underline{|t| = 0,3126}$$

b) $$t = \frac{b_A - b_B}{\sqrt{|s.e.b_A| + |s.e.b_B|}} \qquad (10)$$

$$t = \frac{3,27328 - 3,48686}{\sqrt{0,1722 + 0,1089}}$$

$$\underline{|t| = 0,4028}$$

Freiheitsgrade n = 12
Sicherheitsschwelle P = 0,05
Sicherheitspunkt $t_P = \pm 2,179$

|t| ist sowohl für die Anstiege als auch für die Verschiebungen wesentlich kleiner als $|t_P|$. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Anstiege und Verschiebungen besteht nicht. Die Meßpunkte gehorchen einer linearen Funktion. Damit ist bewiesen, daß die Reaktion zwischen M-Serum und A-Virus durch die Freundlichsche Adsorptionsisotherme dargestellt wird.

IV) Graphische Darstellungen der Freundlichschen Adsorptionsisothermen für die Reaktionen zwischen Immunseren und Viren

Zwischen den 3 Immunseren und den 3 dazugehörigen Viruspräparaten sind 9 Kombinationen möglich. Hiervon wurden 8 Kombinationen mit Hilfe der photometrischen ACU-Methode experimentell untersucht. Die bei der Auswertung der Versuchsergebnisse erhaltenen Meßpunkte wurden graphisch dargestellt. Mit Hilfe der Fehlerausgleichsrechnung ließ sich durch die Schar der Meßpunkte jeder Reaktion zwischen Immunserum und Virus die Freundlichsche Adsorptionsisotherme legen. In den Abbildungen 2 bis 9 sind die Meßpunkte und die daraus berechneten Adsorptionsisothermen als Funktionen lg(Cbv/Cab) von lg Cfv graphisch dargestellt. Cab ist dabei die Antikörperkonzentration im Meßglas. Es gilt

$$Cab = \frac{Tab}{dab}.$$

Auf der senkrechten Achse sind die Logarithmen der Konstanten a und c addiert.

In den graphischen Darstellungen der Abbildung 10 sind die Adsorptionsisothermen als Funktionen lg(Cbv . dab) von lg Cfv nebeneinandergestellt. Die Nebeneinanderstellung in einer Abbildung zeigt ihre Unterschiede in Anstieg und Verschiebung besonders deutlich. Auf der senkrechten Achse sind die Logarithmen von Umrechnungsgröße a, Antikörpertiter Tab und Reaktionsfähigkeitsquotient c addiert.

V) Tabellarische Darstellung der Ergebnisse für die Reaktionen zwischen Immunseren und Viren

Für jede der 8 untersuchten verschiedenen Reaktionen zwischen Immunserum und Virus wurden in wiederholten Versuchen die Konstanten der Freundlichschen Adsorptionsisotherme berechnet. Die tabellarisch verzeichneten Konstanten stellen deshalb gewogene Mittel der Er-

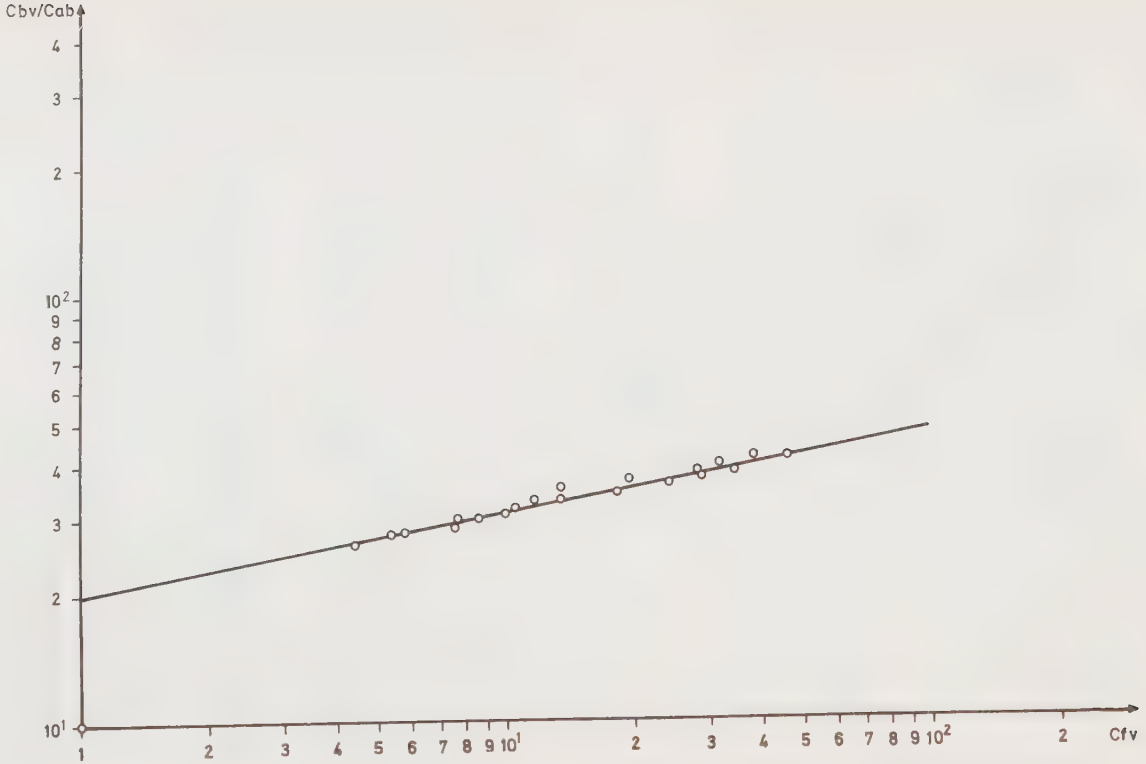


Abb. 2. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen A-Serum und A-Virus

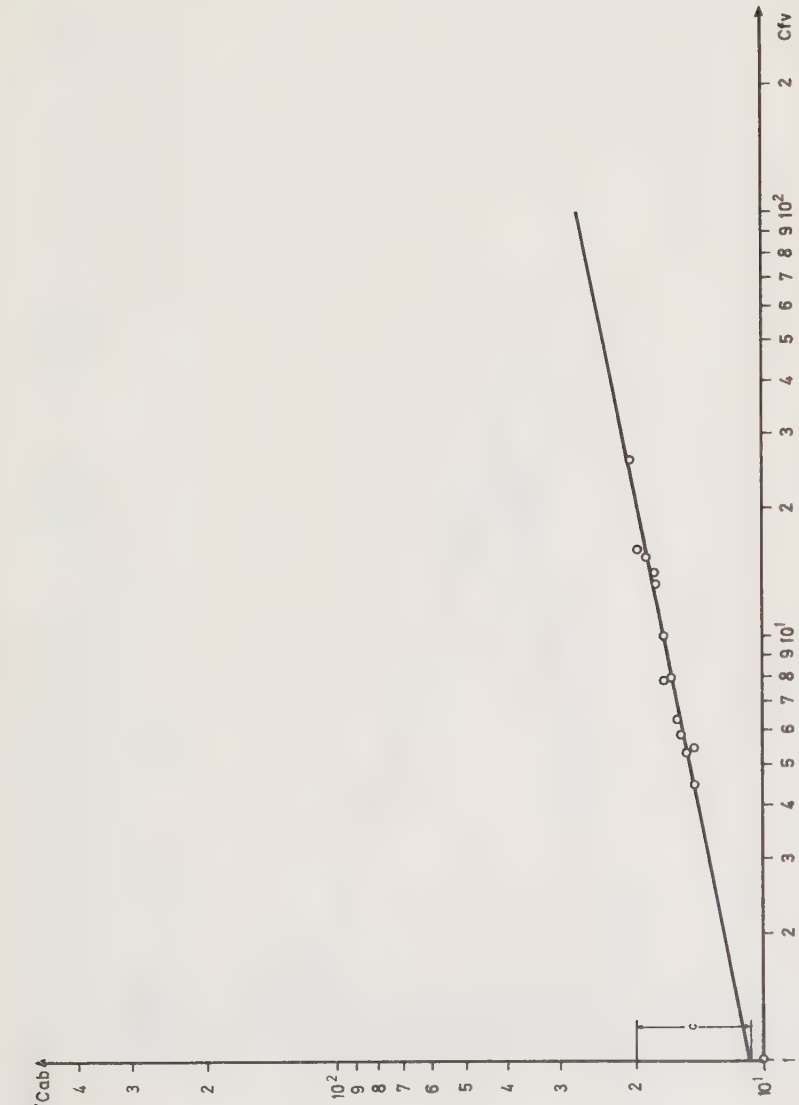


Abb. 3. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen A-Serum und M-Virus

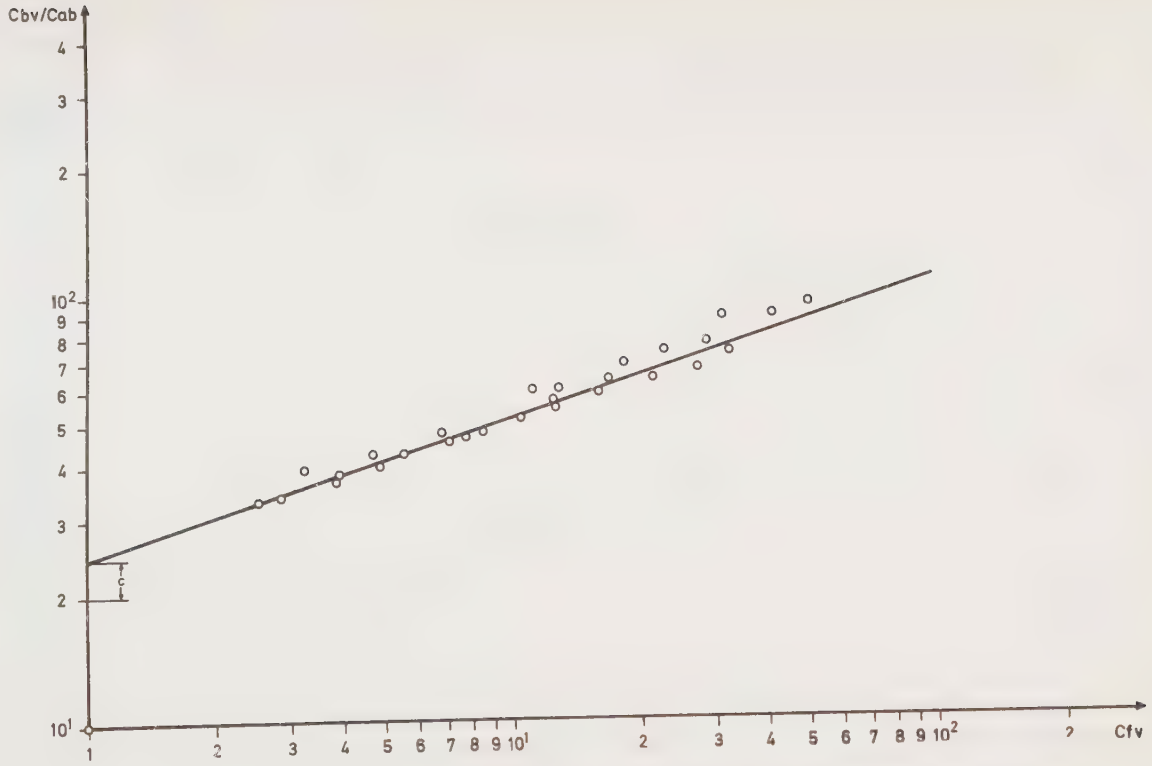


Abb. 4. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen E-Serum und A-Virus

Abb. 5. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen E-Serum und E-Virus

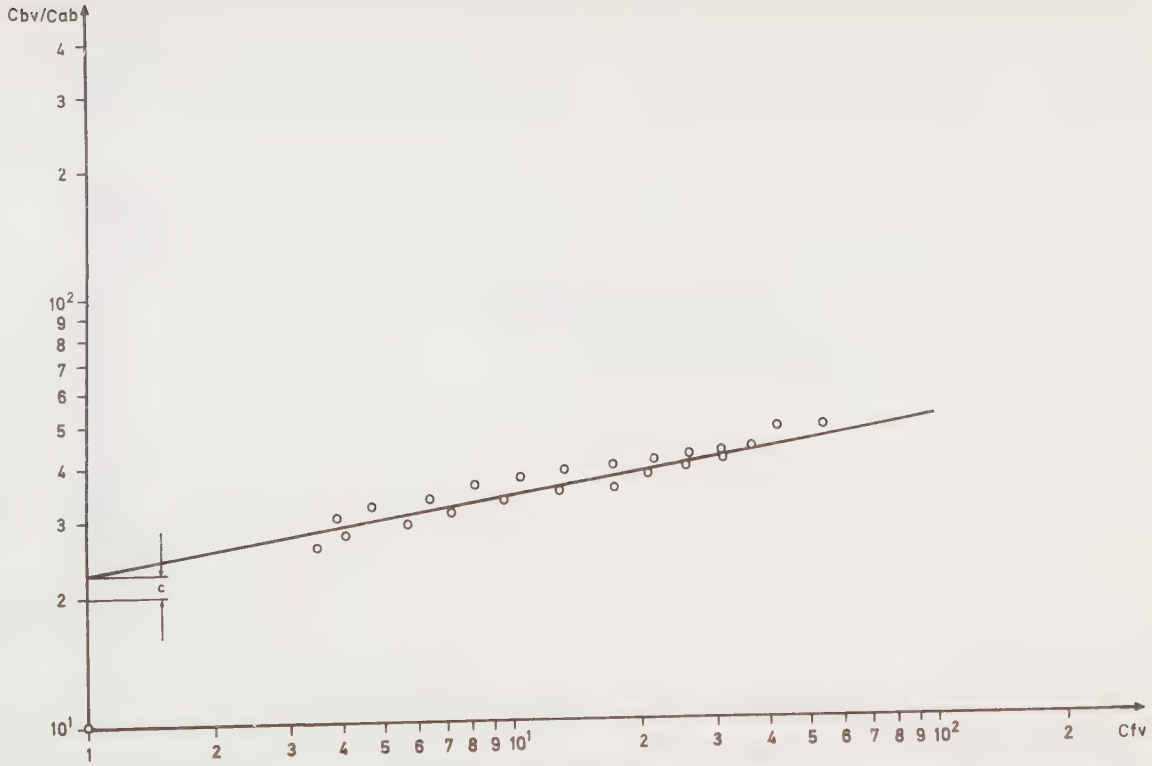


Abb. 6. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen E-Serum und M-Virus

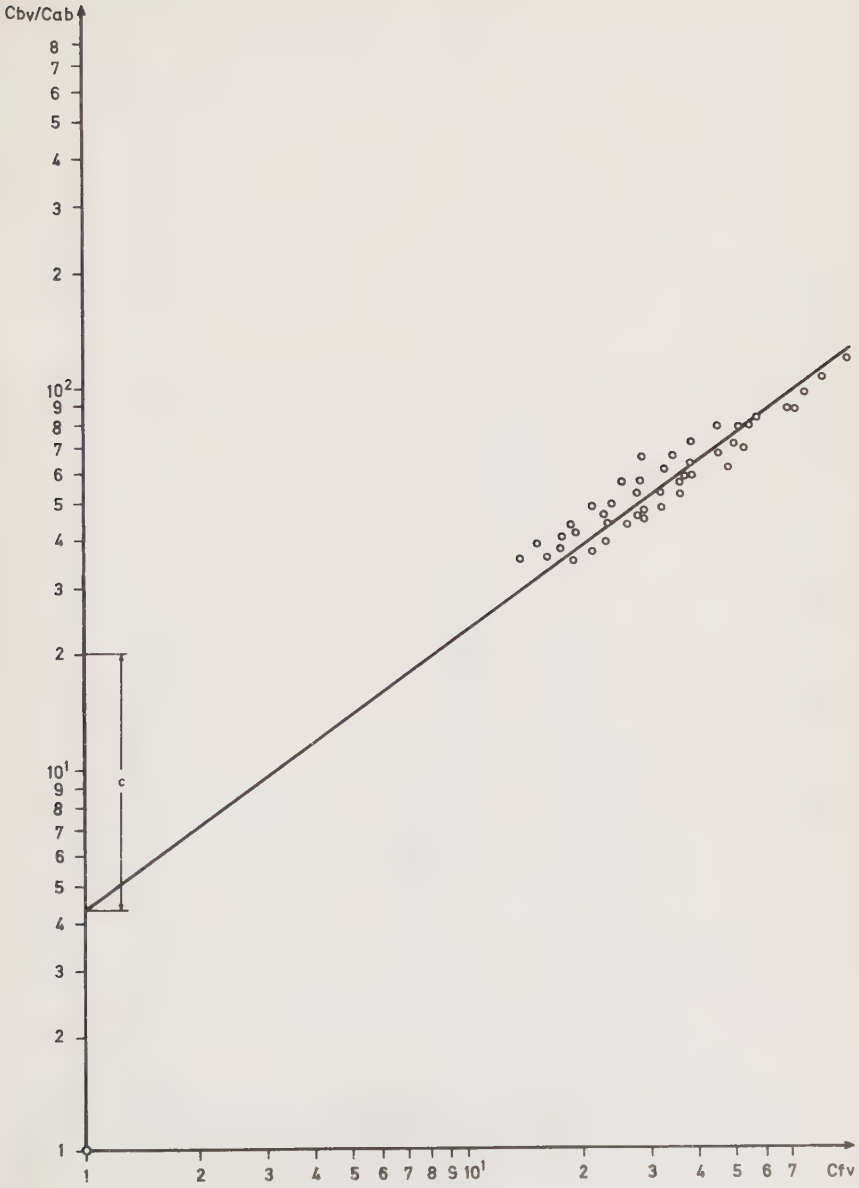


Abb. 7. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen M-Serum und A-Virus

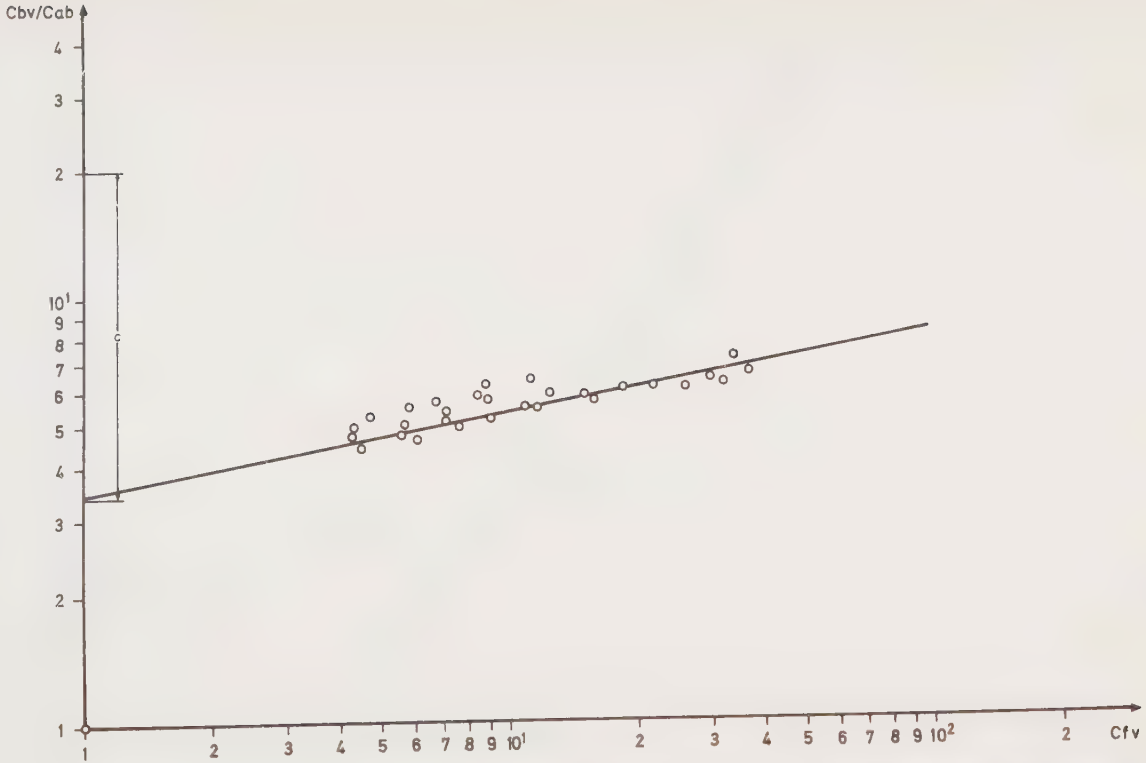


Abb. 8. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen M-Serum und E-Virus

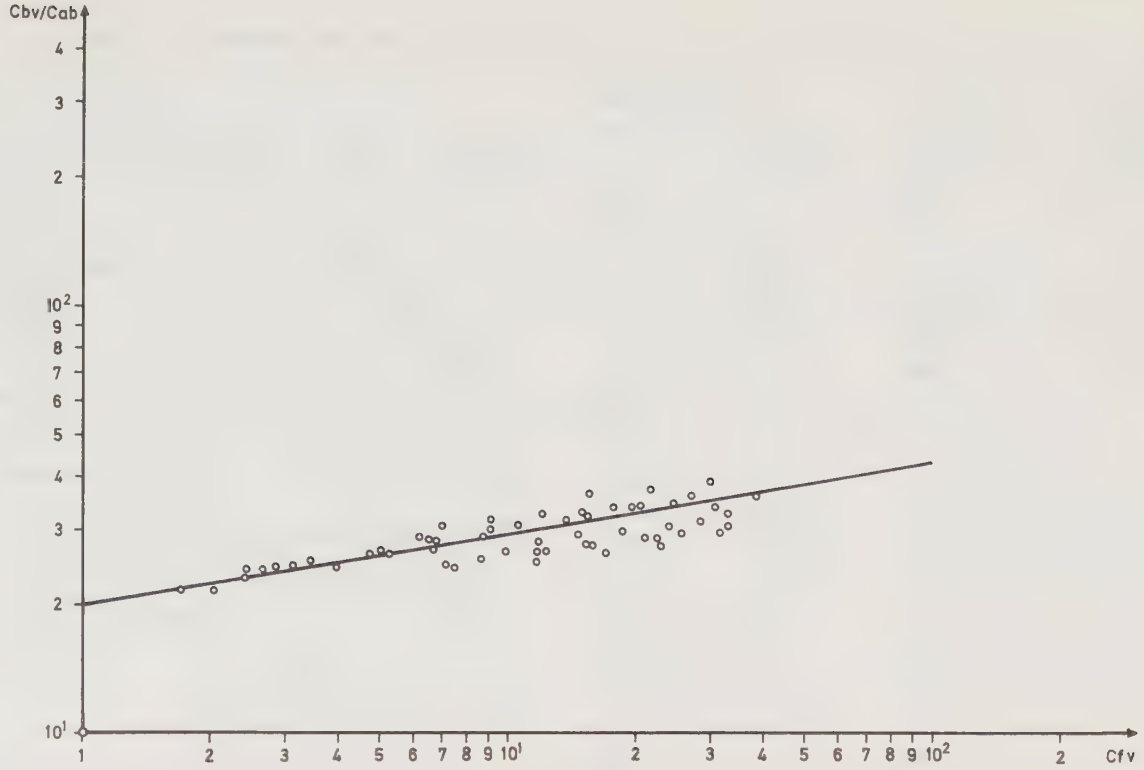
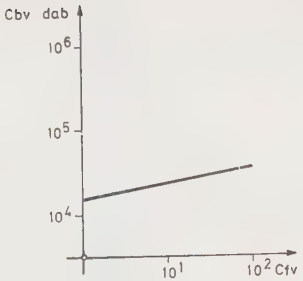
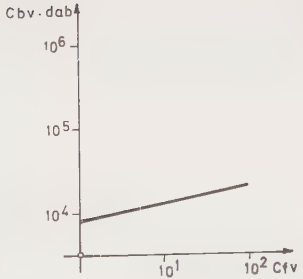


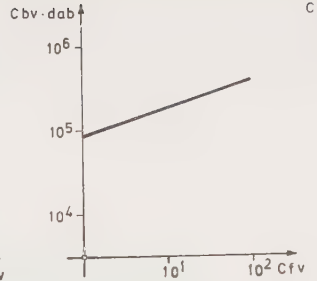
Abb. 9. Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen M-Serum und M-Virus



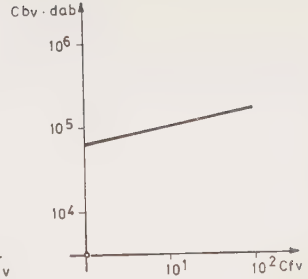
Darst. 1 AS mit AV



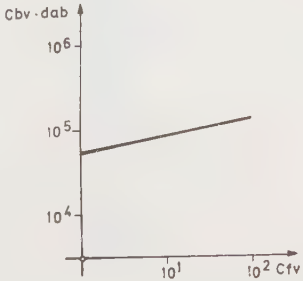
Darst. 2 AS mit MV



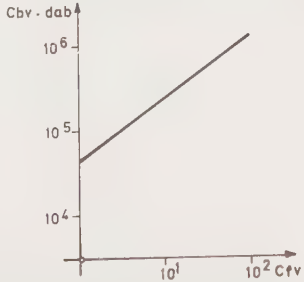
Darst. 3 ES mit AV



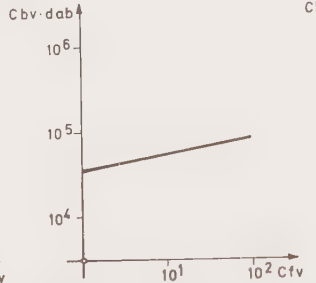
Darst. 4 ES mit EV



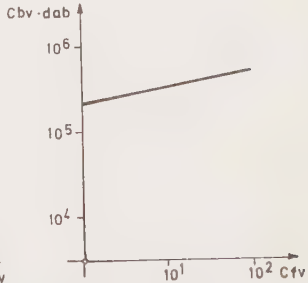
Darst. 5 ES mit MV



Darst. 6 MS mit AV



Darst. 7 MS mit EV



Darst. 8 MS mit MV

Abb. 1o. Adsorptionsisothermen für die Reaktionen zwischen Seren und Viren

gebnisse dar, die bei der Auswertung der einzelnen Versuchsprotokolle erhalten wurden. Jede der 8 Reaktionsmöglichkeiten wurde einmal auf das Vorhandensein von Korrelation und Linearität untersucht, da hiervon die Gültigkeit der Adsorptionsisotherme abhing. Siehe Tabelle 4 auf Seite 26. Aus der Tabelle geht hervor, daß in jedem untersuchten Falle die Freundlichsche Adsorptionsisotherme gilt. Es ist ersichtlich, wie sich die Konstanten der Isotherme zum Teil deutlich voneinander unterscheiden.

VI. Untersuchungen über die Unterschiede der Konstanten der Freundlichschen Adsorptionsisotherme

Mit Hilfe statistischer Formeln (14) über den Unterschied zweier Regressionen bzw. Durchschnitte wurde in mehrfachen Ansätzen untersucht, inwieweit die Abweichungen der Konstanten voneinander statistisch signifikant oder nur zufällig sind.

1.) Die Regressionskoeffizienten 1/N der Reaktionen M-Serum mit A-Virus und E-Serum mit A-Virus haben gegenüber allen übrigen Regressionskoeffizienten eine statistisch signifikante Änderung erfahren. Innerhalb der passagegleichen Reaktionen ist ein statistischer Unterschied der Regressionskoeffizienten der Reaktion E-Serum mit E-Virus gegenüber M-Serum mit M-Virus höchst wahrscheinlich. Siehe Tabelle 5 auf Seite 27.

2.) Die Antikörpertiter Tab der passagegleichen Reaktionen unterscheiden sich statistisch signifikant untereinander. Siehe Tabelle 6 auf Seite 27.

Reaktion	1/N	a	Tab_{eff} [ACU]	c	Korrelation r	$r_{0,001}$	Linearität t_m	t_b	$t_{0,05}$
A-Serum mit A-Virus	0,1863	20	715	1,00	1,0170	0,6788	0,5883	0,6434	2,101
A-Serum mit M-Virus	0,1983	20	389	0,54	1,0060	0,9507	0,5192	0,5313	2,262
E-Serum mit A-Virus	0,3201	20	4235	1,23	0,9990	0,8471	0,5349	0,6154	2,262
E-Serum mit E-Virus	0,1924	20	3442	1,00	1,0010	0,9249	0,3426	0,4377	2,201
E-Serum mit M-Virus	0,1741	20	3876	1,13	0,9876	0,9507	0,7168	0,6931	2,228
M-Serum mit A-Virus	0,7332	20	2298	0,21	0,9903	0,7420	0,3126	0,4028	2,179
M-Serum mit E-Virus	0,1861	20	1800	0,17	0,9845	0,8721	0,0569	0,0577	2,228
M-Serum mit M-Virus	0,1684	20	10750	1,00	0,9820	0,8721	0,5359	0,5066	2,131

Tab. 4 Experimentelle Ergebnisse der Reaktionen zwischen Immunseren und Viren mittels der photometrischen ACU-Methode von Influenzavirusstamm A/1/England/19/55

Reaktionen		Unterschiede der 1/N		Gesichert für P<
MS mit AV	AS mit AV	0,7332	0,1863	0,001
" " "	AS mit MV	"	0,1983	"
" " "	ES mit AV	"	0,3201	"
" " "	ES mit EV	"	0,1924	"
" " "	ES mit MV	"	0,1741	"
" " "	MS mit EV	"	0,1861	"
" " "	MS mit MV	"	0,1684	"
ES mit AV	AS mit AV	0,3201	0,1863	"
" " "	AS mit MV	"	0,1983	"
" " "	ES mit EV	"	0,1924	"
" " "	ES mit MV	"	0,1741	"
" " "	MS mit AV	"	0,7332	"
" " "	MS mit EV	"	0,1861	"
" " "	MS mit MV	"	0,1684	"
ES mit EV	MS mit MV	0,1924	0,1684	0,01

Tab. 5 Ergebnisse der Untersuchungen über die statistischen Unterschiede der Regressionskoeffizienten

Reaktionen		Unterschiede der Tab		Gesichert für P<
AS mit AV	ES mit EV	715	3442	0,001
ES mit EV	MS mit MV	3442	10740	"
MS mit MV	AS mit AV	10740	715	"

Tab. 6 Ergebnisse der Untersuchungen über die statistischen Unterschiede der Antikörpertiter

3.) Der Reaktionsfähigkeitsquotient c des M-Serums mit dem M-Virus unterscheidet sich statistisch signifikant von den Reaktionsfähigkeitsquotienten mit dem A- und E-Virus. Die anderen beiden Seren zeigen entweder keine statistisch signifikanten Änderungen der Reaktionsfähigkeitsquotienten gegenüber den einzelnen Viren, oder die Anzahl der Versuche reicht nicht aus, um eine statistische Aussage zu gestatten. Siehe Tabelle 7.

Reaktionen		Unterschiede der c		Gesichert für P<
MS mit MV	MS mit AV	1,00	0,21	0,001
" " "	MS mit EV	"	0,17	"

Tab. 7 Ergebnisse der Untersuchungen über die statistischen Unterschiede der Reaktionsfähigkeitsquotienten

D) ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG

Der vorliegenden Arbeit lag folgende Fragestellung zugrunde:
Die Differenzierung zwischen homologen und heterologen Antigen-Antikörper-Reaktionen erfolgt bei der photometrischen ACU-Methode anhand des Kriteriums, daß nur für die homologe Antigen-Antikörper-Reaktion die Freundlichsche Adsorptionsisotherme gültig ist, während für die Reaktion von Virus mit heterologen Antikörpern eine andere Proportionalität gilt. Es war zu prüfen, inwieweit die Gültigkeit der Freundlichschen Adsorptionsisotherme als Erkennungskriterium für das Vorliegen einer homologen Antigen-Antikörper-Reaktion auch dann noch gegeben ist, wenn unterschiedliche Passageformen eines gegebenen Virus mit gegen diese unterschiedlichen Passageformen gerichteten homologen Antikörpern zur Reaktion gebracht werden.

Die dargelegten Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß bei Verwendung von einer Reihe von Mäuse- und zusätzlichen Eipassagen unterworfenem Virus des Stammes A/1/England/19/55 in jedem Fall die Freundlichsche Adsorptionsisotherme für die Reaktion mit homologen Antikörpern gültig war, auch dann, wenn die Antiseren durch Impfung mit den unterschiedlichen Passagen dieses Virusstammes hergestellt wurden.

Damit kann die eingangs genannte Fragestellung dahingehend beantwortet werden, daß das Erkennen des Vorliegens einer homologen Antigen-Antikörper-Reaktion anhand des Nachweises der Gültigkeit der Freundlichschen Adsorptionsisotherme durch die Verwendung von einer Reihe von Mäuse- und zusätzlichen Eipassagen unterworfenem Virus und den entsprechenden Antiseren nicht beeinflußt wird.

Daß die angewendeten Passagierungen des Virus dabei ausreichten, die Antigen-Antikörper-Reaktion meßbar zu beeinflussen, kann daraus geschlossen werden, daß die unterschiedlichen Viruspassagen gegenüber den einzelnen Antiseren unterschiedliche Werte der Konstanten 1/N und c der Isotherme aufwiesen.

Die Ursachen für die Änderungen dieser Konstanten in Abhängigkeit von der Passagierung des Virus sind im einzelnen nicht bekannt. Es kann jedoch angenommen werden, daß das Influenzavirus je nach der Art der Zellen, in denen es synthetisiert wird, Normalkomponenten in sich trägt, deren Anwesenheit den unterschiedlichen Reaktionsausfall bedingt. Wäre diese Interpretation richtig, so würde die Bestimmung der Konstanten eine Möglichkeit zur Charakterisierung von Virus und Antikörpern in Bezug auf Normalkomponenten eröffnen.

S c h r i f t t u m

1. BURNET, F.M.: Variation in influenza viruses. In R. Doerr, C. Hallauer: Handbuch der Virusforschung, II. Ergänzungsbd., S. 47-65. Springer, Wien 1950
2. DAVENPORT, F.M., A.V. HENNESSY, J. DRESCHER, J. MULDER, T. FRANCIS, Jr.: Further observations on the relevance of serologic recapitulation of human infection with influenza viruses. J. Exper. Med. 120, 1087-1097 (1964)
3. DAVENPORT, F.M., A.V. HENNESSY, J. DRESCHER, R.G. WEBSTER: Analytical, serological and clinical experience with the hemagglutinating subunits of influenzy A virus. Ciba Foundation Symposium on Cellular Biology of Myxovirus Infections, S. 272-287. J. and A. Churchill, London 1964
4. DRESCHER, J.: Über Hämagglutinin- und Antikörpergehaltsbestimmungen. 2. Mitteilung: Untersuchung über die eine Hämagglutination hemmenden Antikörper und Beschreibung eines photometrischen Verfahrens zur Antikörpergehaltsbestimmung. Zbl. Bakt. I. Orig. 169, 461-470 (1957)
5. DRESCHER, J.: Über Hämagglutinin- und Antikörpergehaltsbestimmungen. 5. Mitteilung: Untersuchungen über die Reaktion zwischen Virus und spezifisch die Hämagglutination hemmenden Antikörpern bei den Influenzavirusstämmen A'/Berlin/7/56 (Dutch), B/Berlin/2/55 und D/Sendai. Zbl. Bakt. I. Orig. 175, 485-504 (1959)
6. DRESCHER, J.: Über die Beziehungen zwischen Antigenzufuhr und Antikörperbildung. 1. Mitteilung: Beschreibung einer Methodik zur Gewinnung hochtitriger Immunseren mittels Antigendauerreizen. Zbl. Bakt. I. Orig. 177, 149-160 (1960)

7. DRESCHER, J., F.M. DAVENPORT, A.V. HENNESSY: Photometric methods for the measurement of hemagglutinating viruses and antibody. II. Further experience with antibody determinations and the description of a technique for analysis of virus mixtures. J. Immunol. 89, 805-814 (1962)
8. DRESCHER, J., A.V. HENNESSY, F.M. DAVENPORT: Photometric methods for the measurement of hemagglutinating viruses and antibody. I. Further experience with a novel photometric method for measuring hemagglutinins. J. Immunol. 89, 794-804 (1962)
9. DRESCHER, J., F.C. LANGE: Über Hämagglutinin- und Antikörpergehaltsbestimmungen. 4. Mitteilung: Beschreibung eines photometrischen Verfahrens zur Bestimmung von spezifisch und von unspezifisch die Hämagglutination hemmenden Antikörpern. Zbl. Bakt. I. Orig. 173, 185-195 (1958)
10. FAZEKAS DE ST.GROTH, S.: Methods in immunochemistry of viruses. 2. Evaluation of parameters from equilibrium measurements. Austral. J. Exp. Biol. 39, 563-582 (1961)
11. FAZEKAS DE ST.GROTH, S., R.G. WEBSTER: Methods in immunochemistry of viruses. 1. Equilibrium filtration. Austral. J. Exp. Biol. 39, 549-562 (1961)
12. FREUNDLICH, H.: Kapillarchemie. Akademische Verlagsges., Leipzig 1909
13. HENNEBERG, G., H. KÖHLER: Praktikum der Virusdiagnostik. G. Fischer, Stuttgart 1961
14. LINDER, A.: Statistische Methoden. Birkhäuser, Basel u. Stuttgart 1960
15. RAETTIG, H.J., J. DRESCHER: Adsorptionsvorgänge bei Virusarten. 3. Mitteilung: Untersuchungen über die Reaktion von T_3-Phagen mit spezifischen Antikörpern. Zbl. Bakt. I. Orig. 171, 393-400 (1958)

An dieser Stelle ist es mir ein Herzensbedürfnis, Herrn Prof. Dr. med. Georg Henneberg für die Vergabe der experimentellen Untersuchung an mich zu danken. Nur durch seinen selbstlosen Einsatz zur Überwindung von Widerständen und seinen immerwährenden Beistand konnte die Arbeit gedeihen.

Mein vorzüglicher Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Drescher, welcher durch seine theoretischen und praktischen Arbeiten auf diesem Gebiet die Durchführung und Berechnung der Versuche in der vorliegenden Form erst ermöglicht hat.

L E B E N S L A U F

Geboren:	Am 27. Februar 1937 in Stettin/Oder als Sohn des Schiffbauingenieurs Reinhold Hintz.
Schulbesuch:	1943 - 45 Volksschule Kosenow Kreis Anklam, 1946 - 55 Grund- und Oberschule Schwerin/Mecklenburg.
Abitur:	Reifeprüfung am 4. Juni 1955 an der Goethe-Oberschule Schwerin/Mecklenburg.
Studium:	1955 Maschinenbau an der Hochschule Karl-Marx-Stadt, 1956/57 Physik an der Technischen Universität Berlin, 1957 - 63 Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.
Examen:	Medizinisches Staatsexamen am 9. April 1963 an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.
Medizinal-assistentenzeit:	Von 1963 - 65 in Berlin auf der Chirurgischen Abteilung des Jüdischen Krankenhauses, auf der Geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Dominikus-Krankenhauses, in der Klinik für Lungenkranke Heckeshorn, auf der Inneren Abteilung des Evangelischen Waldkrankenhauses Spandau, auf der Chirurgischen Abteilung und Dermatologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Spandau.
Approbation:	Bestallung als Arzt mit Geltung vom 15. April 1965.
Vollassistentenzeit:	Von April 1965 bis März 1966 auf der Chirurgischen Abteilung des Franziskus-Krankenhauses Berlin, von April 1966 bis März 1967 auf der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Wilmersdorf in Berlin, seit April 1967 im Pathologischen Institut des Städtischen Behring-Krankenhauses Berlin.

Berlin, den 16. September 1967